

• 博士之窗 •

补肾清利活血法对大鼠残肾细胞外基质影响的实验研究*

阳 晓¹△ 魏 毅² 刘晓文² 张进华² 朱文锋¹△ 向华林¹

内容提要 目的:探讨补肾清利活血法延缓肾小球硬化的有效性和作用环节。方法:在 5/6 肾切除残肾模型大鼠的基础上,运用免疫组织化学及常规病理等方法观察补肾清利活血法对肾小球细胞外基质(ECM)蓄积及其部分调控机制的影响。结果:残肾模型大鼠术后 1 周开始给予补肾清利活血中药,术后 5 周血肌酐(SCr)、尿素氮(BUN)、尿蛋白显著降低;病理结果示 ECM 多种成分(I 和 IV 型胶原、层粘连蛋白)的蓄积显著减少,肾小球内细胞数及增殖细胞核抗原阳性细胞数显著减少,肾小球硬化程度减轻;在降低 BUN、SCr 方面显著优于西药依那普利。结论:补肾清利活血法能显著减少残肾模型大鼠肾小球 ECM 蓄积,改善肾功能,减缓肾小球硬化。

关键词 补肾清利活血法 肾小球硬化 细胞外基质 免疫组织化学

Experimental Study on Effect of Bushen Qingli Huoxue Treatment on Glomerular Extracellular Matrix of Remnant Kidney in Rats YANG Xiao, WEI Yi, LIU Xiaowen, et al. Hunan Medical College of TCM, Changsha (410007)

Objective: To study the effect of Bushen Qingli Huoxue (BQH) treatment on glomerular extracellular matrix (ECM) and in retarding glomerular sclerosis in rats and to explore the mechanism and key of regulation. **Methods:** Animal model was established by 5/6 nephrectomy and the study was carried out by using immune histochemical and pathological methods. Treatment of BQH started 1 week after operation. **Results:** After being treated with BQH, the serum creatinine (SCr), blood urea nitrogen (BUN) and urinary protein excretion reduced markedly. Pathological examination showed accumulation of ingredients of glomerular ECM such as type I, IV collagen and laminin decreased significantly, the number of glomerular cells and proliferation cell nuclear antigen positive cells also decreased obviously, and showed that the glomerular sclerosis was retarded. The effect of BQH was similar to that of Enapril, but superior to that of Enapril in reducing BUN and SCr. **Conclusion:** BQH has the effects of reducing ECM accumulation, improving renal function and retarding glomerular sclerosis.

Key words Bushen Qingli Huoxue treatment, glomerular sclerosis, extracellular matrix, immunohistochemistry

肾小球硬化是慢性肾功能衰竭(简称慢性肾衰)的病理基础。细胞外基质(ECM)在肾小球内进行性蓄积是肾小球硬化过程中的一个中心环节^{〔1〕}。我们在临床研究发现,慢性肾衰早期的主要中医病机是脾肾气阴两虚、湿热内蕴、瘀血阻滞^{〔2〕}。根据其主要病机,结合临床经验,我们以补肾健脾、清热利湿、活血祛瘀(简称补肾清利活血)作为慢性肾衰早期的主要治则。

本研究通过观察该法对大鼠 5/6 肾切除残肾模型早、中期 ECM 蓄积及其部分调控机制的影响,探讨该法延缓肾小球硬化的有效性和作用环节。

材料和方法

1 动物 健康 SD 雄性大鼠(二级),体重 160 ~ 200g,购自第一军医大学动物所。

2 药物 (1)补肾清利活血中药由黄芪 30g 生地 15g 土茯苓 30g 泽泻 10g 鬼箭羽 15g 丹参 10g 等组成,将中药制成浸膏,每克含生药 5g,由第一军医大学中医系制剂室生产,临用时配成 1.5g/ml 的药液。(2)依那普利(简称西药)由默沙东(澳大利亚)

* 湖南省教委科研基金资助(No.96145);系博士研究生毕业论文的部分内容

1. 湖南中医学院(长沙 410007);2. 第一军医大学

△ 现在中山医科大学附属第一医院肾内科(广州 510080);* 导师

公司美国默克公司分部生产,10 mg/片,临用前用蒸馏水配制成 0.4 mg/ml 药液。

3 试剂 一抗有兔抗人和动物 I 型胶原(Col I,博士德公司产品),既用型;小鼠抗人 IV 型胶原(Col IV,DAKO 公司产品),工作浓度 1:100;兔抗人和动物层粘连蛋白(LN,Sigma 公司产品),既用型;小鼠抗人和动物增殖细胞核抗原(PCNA,ZYMED 公司产品),既用型。二抗有生物素化山羊抗小鼠、山羊抗兔 IgG(博士德公司产品),工作浓度为 1:100;SABC 试剂盒(博士德公司产品)。

4 造模及分组 将 24 只大鼠随机分为假手术组、模型组、西药组及中药组。各组大鼠自由饮水,饲以标准蛋白饲料。除假手术组仅行腹部切开及缝合外,其余各组均行 5/6 肾切除进行造模(即用戊巴比妥钠 25 mg/kg 腹腔注射将大鼠麻醉,分离左肾,行上下极肾切除,明胶海绵压迫止血;1 周后切除右肾,方法同上),术后 1 周根据尿蛋白含量及体重将动物随机分组,每组 6 只,假手术组及模型组给予蒸馏水 10 ml/kg,西药组给予依那普利 5 mg/kg,中药组给予中药煎液 34 g/kg。各组动物每日灌胃 1 次,连续 4 周,4 周末用代谢笼收集 24h 尿液,测尿量,留取尿样测尿蛋白;腹主动脉取血测尿素氮(BUN)、肌酐(SCr);取肾标本做光镜及免疫组化检测。

5 生化指标检测与方法 (1)BUN 测定:采用脲酶-Berthelot 比色法(试剂盒由卫生部上海生物制品研究所提供);(2)SCr 测定:采用 Jaffe 氏反应法(试剂盒由宁波市临床检验中心监制);(3)尿蛋白(Upro)测定:采用三氯醋酸比浊法(三氯醋酸由广州医药站监制,批号 850901)。测试仪器为 752 紫外分光光度计(上海第三分析仪器厂)。

6 组织形态学检测 用于光镜及免疫组化的肾组织标本用 10%中性福尔马林固定,石蜡包埋,3 μm 切片作 HE 和 PAS 染色,计数每个肾小球横截面细胞核总数(肾小球细胞核数少于 50 个者剔除);按半定量计分法测量肾小球硬化指数(SI)⁽³⁾,每只动物计数 25 个肾小球,取其平均值。

7 免疫组织化学染色 按试剂盒说明书进行,显微镜观察。阴性对照组以正常兔 IgG 及 PBS 替代一抗。每组取 3 只动物,每张切片至少观察 25 个肾小球;PCNA 阳性细胞采用直接计数法,其余各指标按文献⁽⁴⁾报道半定量计分(0:肾小球染色无定位性增加;1+:1%~25%肾小球血管袢呈局灶增强的染色;2+:25%~50%肾小球血管袢呈局灶增强的染色;3+:50%~70%肾小球血管袢呈局灶增强的染色;4+:>

75%肾小球血管袢呈局灶增强的染色)。

8 统计学分析 计量资料采用方差分析,对不满足参数统计条件的资料比较用秩和检验,连续变量作相关分析,全部统计采用 SPSS 统计软件完成。

结 果

1 各组大鼠血 BUN、SCr、Upro 含量测定结果 见表 1。BUN 含量:造模后 5 周模型组、西药组、中药组均显著高于假手术组($P < 0.01$);中药组显著低于模型组和西药组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。SCr 含量:模型组、西药组均显著高于假手术组($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$);中药组均显著低于模型组和西药组($P < 0.05$)。Upro 含量:造模后各组均显著高于假手术组($P < 0.01$);中药组和西药组均显著低于模型组($P < 0.01$),且中药组显著低于西药组($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠血 BUN、SCr、Upro 含量测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	BUN(mmol/L)	SCr(μmol/L)	Upro(g/L)
假手术	6	7.42 ± 1.35	65.71 ± 13.29	0.14 ± 0.02
模型	6	16.61 ± 3.55**	93.11 ± 9.68**	3.10 ± 0.17**
西药	6	14.07 ± 1.17**	88.11 ± 6.17*	2.01 ± 0.13** ▲▲
中药	6	10.72 ± 1.46** ▲▲▲	76.62 ± 4.67 ▲▲	1.43 ± 0.18** ▲▲▲▲

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$;与西药组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$

2 各组大鼠肾脏病理改变情况 从光镜可见,假手术组大鼠肾小球血管壁正常,系膜细胞无增生;间质无明显炎症细胞浸润。模型组则可见包氏囊扩张,肾小球血管袢狭窄、闭塞,管壁增厚,细胞大量增生,基质增多,系膜区增宽,间质炎症细胞浸润,近曲小管浊肿,有大量管型。西药组肾小球毛细血管袢充血显著,部分管袢增厚,管腔变窄,系膜区增宽,间质炎症细胞浸润较少,管型多;中药组肾小球毛细血管袢扩张、开放,细胞增生及基质增多较模型组轻,间质中少量炎症细胞浸润,管型较少。SI 在造模各组均显著高于假手术组($P < 0.01$),中药组和西药组显著低于模型组($P < 0.01$, $P < 0.05$),见表 2。

3 各组大鼠肾小球 ECM 半定量分析 见表 2。ECM 含有多种成分(其中有 Col I、Col IV 和 LN)。假手术组中 Col I 主要在肾间质和血管壁中表达,肾小

表 2 各组大鼠肾小球 SI 及 ECM 半定量结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	ECM			
	SI	Col I	Col IV	LN
假手术	0.12 ± 0.32	0.08 ± 0.27	1.33 ± 0.45	1.29 ± 0.46
模型	2.00 ± 0.75*	0.64 ± 0.53*	2.61 ± 0.59*	2.64 ± 0.56*
西药	1.67 ± 0.76* ▲	0.43 ± 0.49* ▲	2.37 ± 0.49* ▲	2.13 ± 0.64* ▲▲
中药	1.41 ± 0.62* ▲▲	0.41 ± 0.49* ▲	2.33 ± 0.47* ▲▲	1.96 ± 0.63* ▲▲

注:与假手术组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$;每组均为 6 个样本数

球内一般无表达或极少量表达(0~1级);造模后各组大鼠肾小球内 Col I 均表达少量($P < 0.01$),主要出现在系膜区;而中药组和西药组显著低于模型组($P < 0.05$)。Col IV 与 LN 正常(即假手术组)在肾小管基底膜、肾小球内毛细血管基底膜表达(1~2级),造模后两种胶原在肾小球内表达均增加($P < 0.01$),其染色增加的区域通常与细胞增生区域有关;在硬化的肾小球染色范围增大,而染色强度通常弱于 ECM 蓄积的早期阶段。半定量结果示中药组和西药组 Col IV 及 LN 在肾小球内表达显著低于模型组($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$)。

4 各组大鼠肾小球细胞增生情况 见表 3。假手术组肾小球细胞无明显增生,PCNA 阳性细胞少见。模型组肾小球细胞数及 PCNA 阳性细胞数均显著增加($P < 0.01$),中药组和西药组肾小球内细胞总数及 PCNA 阳性细胞数均显著低于模型组($P < 0.01$),且肾小球细胞增生与 PCNA 阳性细胞表达之间呈显著正相关($r = 0.379, P < 0.01$)。

表 3 各组大鼠肾小球细胞及 PCNA 阳性细胞计数结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞总数 (个/肾小球)	PCNA 阳性细胞 (个/肾小球)
假手术	6	56.03 ± 6.43	1.83 ± 1.49
模型	6	81.16 ± 16.62 [*]	8.16 ± 2.78 [*]
西药	6	72.28 ± 13.70 ^{*△}	6.76 ± 2.72 ^{*△}
中药	6	69.73 ± 13.71 ^{*△}	5.79 ± 2.36 ^{*△}

注:与假手术组比较,^{*} $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.01$

讨 论

各种慢性进行性肾小球疾病中,系膜基质的改变是导致肾小球硬化的共同途径^[3]。研究表明蓄积的 ECM 包括正常肾小球具有的 IV 型胶原、层粘连蛋白、纤维连接蛋白等也含有 I 型胶原^[4]。本研究结果显示,5/6 肾切除大鼠术后 5 周肾小球内 IV 型胶原及 LN 显著增多,且与肾小球硬化指数呈正相关,表明肾小球正常细胞外基质成分的过量聚积与肾小球硬化的发生有关。同时我们亦发现残肾模型中出现 I 型间质胶原,说明正常肾小球中不存在的间质胶原能在肾小球病变发展过程中出现,结果与有关文献报道一致^[4]。

ECM 增多与细胞增殖有关。许多研究证实细胞增生出现于 ECM 蓄积之前,并持续存在于 ECM 蓄积及肾小球硬化发展过程中。抑制细胞增生,则可使 ECM 蓄积相对减少;相反,刺激细胞增生则导致 ECM 增多^[5]。PCNA 是一种细胞 DNA 聚合酶的辅助蛋白,其作用是促进 DNA 聚合酶链延伸 DNA 链,且有增强

DNA 聚合酶活性的作用,它在 S 期的细胞核中达到高峰,因此可作为判断 S 期 DNA 含量及细胞增殖分裂的一个标志。国内外学者证明 PCNA 可以作为判断肾小球系膜细胞增生的标志^[6]。本研究资料发现残肾细胞显著增多,PCNA 阳性细胞也显著增多,ECM 蓄积常常与细胞增生区域有关。提示系膜细胞增生可能是本模型 ECM 蓄积的主要原因之一。

肾小球损伤后防止硬化性肾小球病变出现是肾小球疾病防治的重要环节。目前尚无有效方法完全阻断肾小球硬化的进展。SCr 浓度为 177 μmol/L 是慢性肾衰不可逆点,如何抓住这一时机,针对该阶段病机特点处方用药,以逆转或延缓其进展,对预防终末期肾衰具有重要意义。我们临床研究发现,慢性肾衰早期的主要中医病机是气阴两虚,湿热瘀血内阻。因此,我们以补肾健脾、清热利湿、活血祛瘀为法进行组方,方中黄芪、生地益气养阴、补益脾肾;土茯苓、泽泻清热利湿;丹参、鬼箭羽活血祛瘀。实验结果显示,残肾模型术后 1 周开始给予补肾清利活血中药,术后 5 周 SCr、BUN、尿蛋白显著降低;病理结果显示 ECM 多种成分的蓄积显著减少,肾小球硬化减轻,其疗效与西药依那普利基本相似,而在降低 BUN、SCr 方面显著优于依那普利。使用该法后肾小球内细胞数及 PCNA 阳性细胞数显著减少,提示减少细胞增生可能是其减少 ECM 蓄积、减轻肾小球硬化的作用机制之一。

肾小球硬化的发生发展与肾小球血液动力学改变、蛋白尿、高脂血症等因素有关^[7]。现代药理实验证明:生黄芪可降低尿蛋白的排泄,与辅酶 Q₁₀ 配伍治疗肾衰动物可显著改善肾功能^[8];近年来发现黄芪有钙拮抗作用,可减轻缺血心肌细胞钙超载,从而减轻细胞损伤,其机制与黄芪改善细胞膜钙泵功能及减轻氧自由基损伤等因素有关^[9]。日本学者发现对于腺嘌呤诱发的轻度肾损害大鼠,丹参提取物能明显增加其尿中尿素氮、肌酐、钠和无机磷的排出,并且对轻、中度肾损害大鼠脉管系统具有一定程度的调整作用,使肾小球滤过率、肾血流量明显增加,从而逆转其病变^[10]。土茯苓提取物能够溶解粥样硬化斑块内的平滑肌细胞、纤维细胞及泡沫细胞,使已形成的硬化斑块减轻或消退,从而具有抗动脉粥样硬化的作用,同时还能增加尿钠的排量^[11]。本实验结果可能是上述诸药联合作用,通过改善肾小球血液动力学、减少尿蛋白、降血脂、抗氧化等多种途径达到减少 ECM 蓄积,减缓肾小球硬化的结果。

参 考 文 献

- ease. N Engl J Med 1988;318:1657.
2. 阳 晓,朱文锋,胡学军,等.681 例慢性肾衰患者正虚证候分布特点调查分析.中医杂志 1999;40(2):112—114.
 3. Floege J, Johnson RJ, Gordon K, et al. Increased synthesis of extracellular matrix in mesangial proliferative nephritis. Kidney Int. 1991;40:477—488.
 4. Floege J, Aalpers CE, Burns MW, et al. Glomerular cells, extracellular matrix accumulation, and the development of glomerulosclerosis in the remnant kidney model. Lab Invest 1992;66:485—497.
 5. Eng E, Floege J, Young BA, et al. Does extracellular matrix expansion in glomerular disease require mesangial cell proliferation. Kidney Int 1994;45: S45—47.
 6. Prelich G, Tan CK, Kostura M, et al. Functional identity of

- proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase: An auxiliary protein. Nature 1987;326:517—520.
7. Egdio H. Vasoactive hormones and renal sclerosis. Kidney Int 1996;49:578—597.
 8. 陈佐芳,黄志勇,王以立,等.黄芪和辅酶 Q₁₀对肾衰动物作用的实验研究.江苏医药 1989;15(1):12.
 9. 顾娟红,沈惟堂,李自普,等.黄芪对缺血大鼠心肌钙及脂质过氧化物的影响.上海医科大学学报 1997;24(4):270—271.
 10. Hae Young Chung. 丹参提取物改善肾功能的作用.国外医学中医中药分册 1988;10(3):10—13.
 11. 苑辉卿,薛克亮,任红玉.土茯苓的研究概况.中国中药杂志 1997;22(5):315—317.

(收稿:1999-11-05 修回:2000-06-16)

中西医结合治疗病毒性心肌炎 50 例

王桂平¹ 田艳松²

1997 年 3 月~1999 年 9 月,笔者以中西医结合方法治疗病毒性心肌炎 50 例,并与单纯西医治疗的 35 例进行比较,现报告如下。

临床资料 所有病例均为住院患者。诊断标准参照 1987 年全国心肌炎病专题座谈会提出的成人急性病毒性心肌炎诊断参考标准〔中华内科杂志 1987;26(10):600—601〕。治疗组 50 例,男 27 例,女 23 例;年龄 15~51 岁,平均(33±18)岁;病程 4~8 周,平均(6±2)周;其中乏力 40 例,心悸 25 例,气短 23 例,胸闷、胸痛 20 例;心电图 ST-T 改变 37 例,心律失常 29 例〔其中室性早搏 12 例,结性早搏 2 例,房性早搏 10 例,心房纤颤 4 例,室上性心动过速(简称室上速)3 例〕,I 度房室传导阻滞 16 例,心动过缓 5 例。对照组 35 例,男 18 例,女 17 例;年龄 14~52 岁,平均(33±19)岁;病程 4~10 周,平均(7±3)周;其中乏力 23 例,心悸 12 例,气短 14 例,胸闷、胸痛者 13 例;心电图 ST-T 改变 26 例,心律失常 17 例〔其中室性早搏 9 例,房性早搏 2 例,心房纤颤 4 例,室上速 2 例〕,I 度房室传导阻滞 11 例,心动过缓 5 例。

治疗方法 治疗组用自拟益气解毒汤:生黄芪 30g 太子参 10g 麦冬 10g 五味子 10g 丹参 15g 当归 10g 金银花 10g 板蓝根 15g 黄连 10g 茯苓 15g 炒枣仁 30g 炙甘草 10g。频发早搏加灵磁石 30g,珍珠母 30g,苦参 10g;心动过速加柏子仁 10g,龙骨、牡蛎(先下)各 30g;心动过缓加炙麻黄 6g,炮附片 10g,细辛 3g;咽部红肿疼痛加玄参 10g,山豆根 10g,贯众 15g。每日 1 剂,水煎 400ml,分两次服。两周为 1 个疗程,共治疗 2~5 个疗程;并配合能量合剂:ATP 20mg,辅酶 A 50u,细

胞色素 C 15mg,维生素 B₆ 100mg,维生素 C 2g 加入 5%葡萄糖注射液 250ml 中静脉滴注,每日 1 次,两周为 1 个疗程,共 2~5 个疗程。对照组静脉滴注能量合剂,剂量与疗程同治疗组,并口服病毒灵 0.1g,辅酶 Q 10mg,肌苷 0.2g,每日 3 次,两周为 1 个疗程,共 2~5 个疗程。两组均卧床休息并吸氧,每天 8h。

结 果

1 疗效标准 根据《临床疾病诊断依据治愈好转标准》,治愈:临床症状消失,心电图基本恢复正常;显效:临床症状消失或明显减轻,心电图明显改善;有效:临床症状减轻,心电图改善不明显;无效:临床症状及心电图无明显改善。

2 疗效 治疗组 50 例,治愈 30 例,显效 10 例,有效 8 例,无效 2 例,总有效率为 96%;对照组 35 例,治愈 8 例,显效 9 例,有效 11 例,无效 7 例,总有效率 80%。两组患者完成 5 个疗程后,随访 0.5 年,无其他异常。

讨 论 本病是各种病毒感染所致心肌损害,引起心肌局限性或弥漫性炎性病变。中医学认为正气不足,邪毒侵心是发病的关键。笔者自拟益气解毒汤以益气养阴、清热解毒,配合静脉滴注能量合剂效果较满意。方中黄芪益气固表,太子参、麦冬、五味子益气生津,当归、丹参养血活血;金银花、板蓝根、黄连清热解毒;茯苓、炒枣仁宁心安神;炙甘草益气解毒,并调和诸药。现代药理表明:黄芪有抗病毒作用,提高机体诱生干扰素能力,促进抗体生成。生脉饮促进损伤心肌 DNA 合成,改善窦房结供血,消除异位兴奋灶,防治心律失常;丹参、当归能提高机体耐缺氧能力;金银花、板蓝根、黄连抗病毒、抗炎,黄连亦可治疗心律失常;炙甘草抗炎、抗病毒、抗变态反应,具盐皮质激素样作用。笔者以此方加减治疗本病取得较单纯西药治疗更好的临床效果。

1. 北京联合大学中医药学院附属鼓楼中医医院(北京 100009);

2. 中国石油天然气集团中心医院

(收稿:2000-03-30 修回:2000-07-11)